

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名：本間幹啓

本間君は、DNA マイクロアレイを利用してアフリカツメガエルにおいてアクチビンに応答する全く新規の遺伝子 *BENI* を同定した。更に、この *BENI* の機能を解析した結果、初期発生の形作りに非常に重要な原腸陥入に関わる遺伝子であることを明らかにした。以下にその内容を述べる。

アフリカツメガエルは採卵が簡単で胚の操作が簡便であり、更に胞胚期の動物極にはアニマルキャップと呼ばれる未分化細胞からなる領域があり様々な器官へと分化誘導が可能であるので、初期発生研究の非常に良いモデル系である。アニマルキャップはそのまま培養すると外胚葉に分化するが、TGF- β スーパーファミリーに属する蛋白質であるアクチビンで処理すると、中胚葉、内胚葉へも誘導する事ができる。アクチビンはアクチビン・ノーダルシグナルにより情報を伝達するが、このシグナルは正常発生の初期において中胚葉・内胚葉の形成に関与するだけでなく、原腸陥入や体軸形成においても重要な働きを持つことが分かっている。そこで本間君は、アクチビン処理によって発現が変動する遺伝子を探索することにより、初期発生に重要な役割を果たす新規遺伝子を見つけられると考え、研究を行った。

アフリカツメガエル胞胚よりアニマルキャップを切り出し、アクチビン処理群と未処理群に分けて RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて解析した。その結果、処理群と未処理群で発現量の違う 202 個の遺伝子のうち、新規遺伝子または初期発生における機能が未知である遺伝子に注目して 26 候補に絞り込んだ。これらのうち、mRNA の過剰発現やアンチセンス Morpholino oligonucleotide (MO) による機能阻害により初期発生に影響を与える 14 遺伝子を同定した。この 14 遺伝子のうち Unigene Code Xl.7756 は、相同なアミノ酸配列がヒト、マウス、ラット、ミドリフグにおいて見出されたが、いずれにおいても機能に関する報告のない全くの新規の遺伝子であった。そこで本間君は、この遺伝子の初期発生における機能解析を行い、その結果を基にこの遺伝子を *BENI* (*Brachyury Expression Nuclear Inhibitor*) と命名した。

背側動物極側において *BENI* mRNA を過剰発現したり MO により *BENI* の機能阻害をしたりすると、胚の体軸が屈曲したので、*BENI* が原腸陥入運動に関与することが推察された。ところが原口形成や原腸陥入運動の遅滞は観察されなかった。そこで胚の切片を観察したところ、原腸陥入運動の進行に従い薄くなるべき帯域の表皮層が肥厚したままであることが分かった。また、腹側動物極側において *BENI* mRNA を過剰発現すると、

初期原腸胚の腹側帯域の表皮層もまた肥厚したままであった。これらの結果は *BENI* が原腸陥入運動の一つである垂直挿入に関与していることを示唆している。更に、アクチビン処理したアニマルキャップでは、*BENI* mRNA を過剰発現すると伸長運動の阻害を受け、MO で *BENI* の機能阻害をすると伸長運動が亢進したので、*BENI* はやはり原腸陥入運動の一つである中間側方挿入にも関与することが示唆された。このようにして本間君は、*BENI* が原腸陥入運動に関与することを明らかにした。

次に本間君は、*BENI* の作用機構を調べた。これまでに、汎中胚葉マーカー *Xbrachyury* (*Xbra*) を過剰発現すると、MO による *BENI* の機能阻害と同じようにアニマルキャップの伸長運動が亢進することが報告されていた。そこで本間君は、*BENI* が *Xbra* の発現に与える影響に着目して解析を進めた。実際に *BENI* mRNA を過剰発現してみると、*Xbra* の発現が抑制されることが RT-PCR により示された。更に、*Xbra* について胚で WISH を行い、*in vivo* での *BENI* の影響を調べた。その結果、*BENI* mRNA を過剰発現すると *Xbra* の発現は消失するが、MO により *BENI* の機能阻害をしても *Xbra* の発現に変化は見られなかった。以上の結果より、*BENI* が *Xbra* の発現を抑制することが示唆された。この抑制メカニズムを解明するために、*BENI* が核移行シグナルを持つことに着目した。*BENI* と蛍光タンパク質 EGFP との融合タンパク質(*BENI*-EGFP)の DNA コンストラクトと、更に核移行シグナルを欠失したコンストラクトを作製し、mRNA を合成し、胚へ微量注入して細胞内での局在を観察した。その結果、*BENI*-EGFP と N 末端の核移行シグナルを欠失した *BENI*- Δ N-NLS-EGFP は核に局在したが、C 末端の核移行シグナルを欠失した *BENI*- Δ C-NLS-EGFP 及び N 末端 C 末端両方の核移行シグナルを欠失した *BENI*- Δ NLS-EGFP は細胞全体に局在したので、C 末端側の核移行シグナルが重要であることが示唆された。また、背側動物極側に *BENI*-EGFP と *BENI*- Δ N-NLS-EGFP の mRNA を注入した胚は体軸が屈曲したが、*BENI*- Δ C-NLS-EGFP と *BENI*- Δ NLS-EGFP の mRNA 注入した胚は正常だった。これらの一連の実験により本間君は、*BENI* は C 末端側の核移行シグナルによる核局在によって汎中胚葉マーカー *Xbra* の発現を抑制し、結果として原腸陥入運動に影響を与える事を示した。

以上のように本間君は、アクチビン応答因子の中から全くの新規遺伝子である *BENI* の同定に成功し、これが初期発生において重要な原腸陥入運動に関与することと、その作用機構を明らかにした。本研究は非常に独創的であり、発生生物学の発展に大きく寄与するものである。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。